



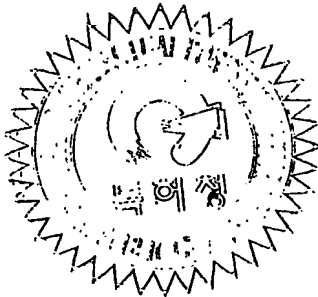
별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2003-0035993
Application Number

출원 년 월 일 : 2003년 06월 04일
Date of Application JUN 04, 2003

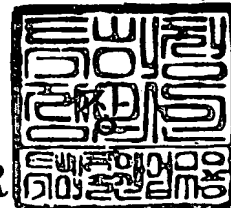
출원 인 : 주식회사 바이오리더스 외 3명
Applicant(s) Bioleaders Corporation, et al.



2004 년 06 월 04 일

특 허 청

COMMISSIONER



PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

【서지사항】

【서류명】	출원인 변경 신고서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2004.02.13
【구명의인(양도인)】	
【명칭】	(주)바이오리더스
【출원인코드】	1-2000-026462-9
【사건과의 관계】	출원인
【구명의인(양도인)】	
【명칭】	(주)바이오리더스재팬
【출원인코드】	5-2003-034344-4
【사건과의 관계】	출원인
【구명의인(양도인)】	
【명칭】	(주)엠디랩
【출원인코드】	1-2001-039726-2
【사건과의 관계】	출원인
【신명의인(양수인)】	
【명칭】	한국생명공학연구원
【출원인코드】	3-1999-034166-5
【지분】	005/100
【대리인】	
【성명】	이처영
【대리인코드】	9-2003-000118-9
【포괄위임등록번호】	2003-021868-5
【포괄위임등록번호】	2003-062807-6
【포괄위임등록번호】	2003-038714-6
【포괄위임등록번호】	2003-020869-0
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2003-0035993
【출원일자】	2003.06.04
【발명의 명칭】	사스 바이러스 항원의 세포표면 발현백터 및 상기 백터에 의해 형질 전환된 미생물
【변경원인】	일부양도

【취지】

특허법 제38조제4항·실용신안법 제20조·의장법 제24조 및 상표법 제12조 제1항의 규정에 의하여 위와 같이 신고합니다. 대리인
이처영 (인)

【수수료】

13,000 원

【첨부서류】

1. 기타첨부서류[양도증, 인감증명서, 지분약정서]_1통

【서지사항】

【서류명】	출원인 변경 신고서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.11.13
【구명의인(양도인)】	
【명칭】	(주)바이오리더스
【출원인코드】	1-2000-026462-9
【사건과의 관계】	출원인
【구명의인(양도인)】	
【명칭】	(주)엠디랩
【출원인코드】	1-2001-039726-2
【사건과의 관계】	출원인
【신명의인(양수인)】	
【명칭】	(주)바이오리더스
【출원인코드】	1-2000-026462-9
【신명의인(양수인)】	
【명칭】	(주)엠디랩
【출원인코드】	1-2001-039726-2
【신명의인(양수인)】	
【명칭】	(주)바이오리더스재팬
【출원인코드】	5-2003-034344-4
【대리인】	
【성명】	이처영
【대리인코드】	9-2003-000118-9
【특기사항】	양수인 순서
【포괄위임등록번호】	2003-021868-5
【포괄위임등록번호】	2003-038714-6
【포괄위임등록번호】	2003-062807-6
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2003-0035993
【출원일자】	2003.06.04
【발명의 명칭】	사스바이러스 항원의 세포표면 발현백터 및 상기 백터에 의해 형질전환된 미생물
【변경원인】	일부양도

【취지】

특허법 제38조제4항·실용신안법 제20조·의장법 제24조 및 상표법 제12조 제1항의 규정에 의하여 위와 같이 신고합니다. 대리인

이처영 (인)

【수수료】

13,000 원

【첨부서류】

1. 기타첨부서류[양도증 및 양도인의 법인인감증명서]_1통

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.06.04
【발명의 명칭】	사스 바이러스 항원의 세포표면 발현벡터 및 상기 벡터에 의해 형질전환된 미생물
【발명의 영문명칭】	Cell Surface Expression Vector of SARS Virus Antigen and Microorganisms Transformed Thereof
【출원인】	
【명칭】	(주)바이오리더스
【출원인코드】	1-2000-026462-9
【출원인】	
【명칭】	(주)엠디랩
【출원인코드】	1-2001-039726-2
【대리인】	
【성명】	이처영
【대리인코드】	9-2003-000118-9
【포괄위임등록번호】	2003-021868-5
【포괄위임등록번호】	2003-038714-6
【발명자】	
【성명의 국문표기】	성문희
【성명의 영문표기】	SUNG, MOON HEE
【주민등록번호】	570603-1024010
【우편번호】	305-308
【주소】	대전광역시 유성구 장대동 325-6 야베스빌라 302호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김철중
【성명의 영문표기】	KIM, CHUL JOONG
【주민등록번호】	561213-1002325
【우편번호】	305-707
【주소】	대전광역시 유성구 신성동 삼성한울아파트 103-801
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

정창민

【성명의 영문표기】

JUNG, CHANG MIN

【주민등록번호】

630118-1047119

【우편번호】

135-010

【주소】

서울특별시 강남구 논현동 132-15

【국적】

KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

홍승표

【성명의 영문표기】

HONG, SEUNG PYO

【주민등록번호】

650826-1019514

【우편번호】

305-751

【주소】

대전광역시 유성구 송강동 송강그린아파트 310-1503

【국적】

KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

이종수

【성명의 영문표기】

LEE, JONG SU

【주민등록번호】

740226-1251211

【우편번호】

456-110

【주소】

경기도 안성시 낙원동 59

【국적】

KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

최재철

【성명의 영문표기】

CHOI, JAE CHUL

【주민등록번호】

770825-1675028

【우편번호】

703-805

【주소】

대구광역시 서구 내당4동 410-7

【국적】

KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

김광

【성명의 영문표기】

KIM, KWANG

【주민등록번호】

680225-1823017

【우편번호】 305-720
【주소】 대전광역시 유성구 신성동 대림두레아파트 103-506
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 주니치구로다
【성명의 영문표기】 SHUNICHI, KURODA
【주소】 7-C-104 가미야마다 수이타, 오사카 565-0872
【주소의 영문표기】 7-C-104 KAMIYAMADA SUITA, OSAKA 565-0872
【국적】 JP
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】
【서열개수】 28
【서열목록의 전자파일】 첨부
【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대리인 이처영 (인)
【수수료】
【기본출원료】 20 면 29,000 원
【가산출원료】 28 면 28,000 원
【우선권주장료】 0 건 0 원
【심사청구료】 0 항 0 원
【합계】 57,000 원
【감면사유】 소기업 (70%감면)
【감면후 수수료】 17,100 원
【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통 2.기타첨부서류[감면서류]_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 중증 급성호흡기 증후군(SARS) 유발 코로나바이러스의 항원과 폴리감마글루탐산 합성효소 복합체를 코딩하는 유전자 pgsB, pgsC 및 pgsA 중 어느 하나 또는 둘 이상을 함유하는 SARS 코로나바이러스 항원의 표면 발현벡터, 상기 표면 발현벡터에 의해 형질전환된 미생물 및 상기 미생물을 함유하는 SARS 백신에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 사스 코로나바이러스 항원을 표면발현하는 재조합 균주를 이용하여 사스의 치료용 또는 예방용 백신을 경제적으로 생산하는 것이 가능하다.

【대표도】

도 3

【색인어】

사스, 코로나바이러스, 표면발현, 백신

【명세서】

【발명의 명칭】

사스 바이러스 항원의 세포표면 발현벡터 및 상기 벡터에 의해 형질전환된 미생물{Cell Surface Expression Vector of SARS Virus Antigen and Microorganisms Transformed Thereof}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 돼지 전염성 위장염 바이러스의 항원성 네 부위(A, B, C, D)와 사스 코로나바이러스의 스파이크 단백질과의 관계를 카이트-둘리틀(Kyte-Doolittle) 방법인 친수성 플롯(hydrophilicity plot), 제임슨-울프(Jameson-wolf) 방법인 항원 인덱스(Antigenic index) 그리고 에미니(Emini) 방법인 표면 확률 플롯(surface probability plot)을 통해 분석한 것을 나타낸 것이다.

도 2는 돼지 전염성 위장염 바이러스의 뉴클레오키프 단백질과 사스 코로나바이러스의 뉴클레오키프 단백질과의 관계를 카이트-둘리틀 방법인 친수성 플롯, 제임슨-울프 방법인 항원 인덱스 그리고 에미니 방법인 표면 확률 플롯을 통해 분석한 것을 나타낸 것이다.

도 3a는 본 발명에 의한 그람음성 및 양성 미생물을 숙주로 하는 표면발현용 전환벡터 pHCE1LB:pgsA-SARS SA의 유전자 지도이고, 도 3b는 본 발명에 의한 pHCE2LB:pgsA-SARS SC의 유전자 지도이다.

도 4는 본 발명에 의한 전환 벡터 pHCE2LB:pgsA-SARS NB를 나타내는 유전자 지도이다.

도 5a는 본 발명에 의한 전환 벡터 pHCE2LB:pgsA-TGEN1의 유전자 지도이다. 도 5b는 간접실시에 1에 따라 세포외막 단백질 pgsA와 융합된 TGEN 항원이 락토바실러스에서 발현되었음

을 SDS-폴리아크릴아미드 젤 전기영동 및 TGEN에 대한 특이 항체와 상기 융합단백질간의 특이적인 결합을 면역블롯팅(western immunoblotting)을 수행하여 확인한 것이다. 도 5b의 레인 1은 형질전환되지 않은 숙주세포인 락토바실러스 카제이, 레인 2와 3은 형질전환된 pHCE2LB:pgsA-TGEN1/락토바실러스 카제이이다.

도 6a는 본 발명에 의한 전환 벡터 pHCE2LB:pgsA-PEDN의 유전자 지도이다. 도 6b는 간접 실시예 2에 따라 세포외막 단백질 pgsA와 융합된 PED N 항원이 락토바실러스에서 발현되었음을 SDS-폴리아크릴아미드 젤 전기영동 및 PED N항원에 대한 항체를 이용한 웨스턴 면역블롯팅(western immunoblotting)을 수행하여 확인한 것이다. 도 6b의 레인 1은 형질전환되지 않은 숙주세포인 락토바실러스 카제이, 레인 2는 형질전환된 pHCE2LB:pgsA-PEDN/락토바실러스 카제이이다.

도 7a와 7b는 본 발명에 의한 표면발현 전환벡터 pHCE1LB:pgsA-TGEN1 및 pHCE1LB:pgsA-PEDN으로 형질전환시킨 락토바실러스 카제이 균주에서 항원기의 표면발현이 확인된 일정량의 균을 구강과 복강으로 각각 세번 혹은 두번 그리고 부스팅 투여한 마우스의 혈청 내 TGEN 및 PEDN 항원기에 대한 IgG 항체가 결과를 엘리자 방법(ELISA, Enzyme-linked Immunosorbent assay)으로 측정하여 그래프로 나타낸 것이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<8> 발명의 분야

<9> 본 발명은 중증 급성호흡기 증후군 (SARS, 사스) 유발 코로나바이러스의 항원을 미생물 표면에 발현시키는 벡터, 상기 벡터에 의해 형질전환된 미생물 및 상기 형질전환된 미생물 또는 그 추출 정제물을 함유하는 사스 예방용 백신에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 사스 유발 코로나바이러스의 항원 단백질을 암호화하는 유전자와 미생물 표면 발현 모체인 폴리감마글루탐산 합성효소 복합체를 코딩하는 유전자 pgsB, pgsC 및 pgsA 중 어느 하나 또는 둘 이상을 함유하는 표면 발현벡터와, 상기 벡터로 형질전환된 미생물 및 상기 형질전환된 미생물을 유효성분으로 포함하는 사스 백신에 관한 것이다.

<10> 발명의 배경

<11> 중증급성호흡기증후군(Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS, 사스)은 2002년 11월부터 중국 광둥지역을 중심으로 처음 발생하여 홍콩, 싱가포르, 캐나다 토론토 등 전 세계로 확산된 신종 전염병이다. 38℃ 이상의 발열과 기침, 호흡곤란, 비정형 폐렴 등의 호흡기 증상을 보이는 사스의 원인체는 변종 코로나바이러스가 병원체로 알려져 있다.

<12> 일반적으로 코로나바이러스는 매우 큰 RNA 바이러스로서 (+)RNA를 가진다. 계놈은 일반적으로 2만 9천에서 3만1천개 정도의 염기로 구성이 되고, 현미경으로 관찰할 때 왕관 모양으로 관찰되며 사람의 상부호흡기 질환, 동물의 호흡기, 간, 신경, 장 관련 질환의 원인이 되며, 자연계에는 세 그룹의 코로나바이러스가 존재하는데 이중 그룹 I과 그룹 II는 포유류에, 그룹 III은 조류에 감염한다.

<13> 자연계의 밝혀진 코로나바이러스는 때때로 면역계가 약화된 사람들에게 폐와 관련된 질병을 유발하고 개, 고양이, 돼지, 쥐, 새 등의 동물에서는 심각한 질병의 원인이 되기도 한다.

매우 높은 돌연변이율을 보이고 또한 재조합율(recombination rate) 역시 25% 정도로 매우 높은 편이다. 아마도 이러한 특성이 기존 코로나바이러스의 변이를 일으켜 변종 코로나바이러스(사스 코로나바이러스)가 되어 동물로부터 인간에게로 전파가 되어 감염되었을 것으로 추측하고 있다.

- <14> 세계보건기구 (World Health Organization, WHO)에 의하면 2002년 11월부터 31개국에서 7,447명의 사스 추정환자가 발생하여 그 중 551명이 사망하였다. 2003년의 사스 감염위험지역은 중국 북경, 광둥, 홍콩, 내몽고, 산서, 천진, 싱가포르, 캐나다 토론토, 대만, 몽골 울란바토르, 그리고 필리핀 등이 대상이 되어 있으나 전세계적으로 확산될 위험성을 내재하고 있다.
- <15> 사스 코로나바이러스는 2002년 발병 이후 독일 열대의학연구소가 처음으로 사스 바이러스의 염기서열 해독을 실시했다. 연구팀은 중합효소연쇄반응(PCR)으로 유전자 증폭이 가능한 특정 유전자 부위에 대한 염기서열 해독을 실시했다. 해독 결과는 독일 생명공학기업인 아르투스사에 제공돼 사스 감염키트를 개발하는데 활용됐고, 이 키트는 사스 의심환자에서 검출한 바이러스 유전자를 증폭시켜 사스바이러스 감염 여부를 알아낼 수 있다.
- <16> 이후 사스바이러스의 전체 게놈 해독작업도 이뤄졌고, 현재까지 12개 이상의 분리주에 대한 염기서열이 완전히 분석되어 알려져 있다. 이중 가장 먼저 분리된 어바니(Urbani)주(사스에 의해 감염되어 사망한 WHO 파견 의사의 이름을 따, SARS-Cov주 Paul A. Rota [2003] 10.1126, Science 1085952, Genbank Accession AY278741)의 전체 염기서열이 미 CDC 연구팀에 의해 해독되었고, 캐나다 브리티시 컬럼비아 암 연구팀은 4월 12일 캐나다 토론토의 환자에서 분리한 사스 Tor2 바이러스주(Marco A. Marra [2003] 10.1126, Science 1085953, GenBank Accession 274119)의 전체 염기서열을 분석하였다.

- <17> 두 연구팀은 각각 서로 다른 곳에서 사스에 감염된 환자로부터 분리한 코로나바이러스를 분석했지만 두 바이러스의 염기 차이는 15개에 불과했다. 이는 사스가 동일한 바이러스에 의해 유발됐음을 보여주는 것이다. 또한, 사스 코로나바이러스의 게놈 분석결과 기존에 알려져 있는 코로나바이러스와의 단백질을 구성하는 요소는 동일하나 게놈 및 게놈에 의한 아미노산의 상동성은 거의 없는 것으로 알려져 있고 그 중에서 그나마 쥐의 간염바이러스와 칠면조의 기관지염 바이러스에 가까운 것으로 나타났다. 그러나 사스 코로나바이러스와 다른 코로나바이러스와 연관성은 분자계통 분류학적 분석에 의해 제시되었는데, 기존의 그룹과는 다른 것으로 나타났다.
- <18> 현재 사스 코로나바이러스의 검출은 PCR로 처음 시작을 하고, 항체검사 양성은 ELISA나 IFA로 판정을 하며 바이러스 분리는 PCR에 의해 확진된 검체에 대해 세포배양 검사에서 바이러스를 분리하여 사스 코로나바이러스의 감염을 확정한다.
- <19> 사스에 대한 근본적인 치료방법은 없으며, 보존적인 지지요법만이 있다. 새로운 전염병인 사스의 원인체인 사스 코로나바이러스에 대한 연구가 현재 시작 단계이기 때문에 예방을 위한 백신은 개발되어 있지 않고, 세계적으로 예방 백신을 개발하기 위해 다각적인 연구가 진행되고 있다.
- <20> 미생물의 세포표면에 원하는 단백질을 부착하여 발현시키는 기술을 세포표면발현(cell surface display)기술이라 한다. 이 세포표면 발현기술은 박테리아나 효모 등 미생물의 표면 단백질을 표면발현 모체(surface anchoring motif)로 사용하여 외래 단백질을 표면에 발현시키는 기술로서 재조합 생백신의 생산, 펩타이드/항체 라이브러리(library) 제작 및 스크리닝(screening), 전세포 흡착제(whole cell absorbent), 전세포 생물전환 촉매 등 다양한 응용범위를 가지고 있는 기술이다. 이 기술은 어떤 단백질을 세포 표면에 발현시키는가에 따라 그 응

용범위가 결정되어지며, 따라서 세포표면 발현기술을 이용한 산업적 응용 잠재력은 상당하다고 할 수 있다.

- <21> 성공적인 세포표면 발현기술을 위해서는 표면발현모체가 가장 중요하다. 얼마나 효과적으로 외래단백질을 세포표면에 발현시킬 수 있는 모체를 선정하고 개발하느냐가 이 기술의 핵심이 된다.
- <22> 따라서 다음의 성질을 가진 표면발현모체를 선정해야 한다. 먼저 외래단백질을 세포표면까지 보내기 위해 세포내막을 통과할 수 있도록 도와주는 분비신호가 있을 것, 둘째 세포외막 표면에 안정되게 외래단백질이 부착될 수 있도록 도와주는 표적신호가 있을 것, 셋째 세포 표면에 다량으로 발현되나 세포의 성장에 거의 영향을 미치지 않을 것, 넷째 단백질의 크기에 관계없고 외래단백질의 3차원 구조에 변화가 없이 안정적으로 발현될 것 등이다. 하지만 위의 조건을 모두 만족시키는 표면발현 모체는 아직까지 개발되지 않은 상태이다.
- <23> 지금까지 알려져 사용된 표면발현모체로는 세포 외막 단백질, 지질 단백질 (lipoprotein), 분비 단백질(secretory protein), 편모 단백질과 같은 표면기관 단백질 등 크게 4가지이다. 그람음성균(Gram negative bacteria)의 경우 LamB, PhoE[Charbit et al., J. Immunol., 139: 1658-1664 (1987); Agterberg et al., Vaccine, 8: 85-91 (1990)], OmpA 등과 같은 세포 외막에 존재하는 단백질을 주로 이용하였고, 지질단백질인 TraT [Felici et al., J. Mol. Biol., 222: 301-310 (1991)], PAL(peptidoglycan associated lipoprotein) [Fuchs et al., Bio/Technology, 9: 1369-1372(1991)] 그리고 Lpp[Francisco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 489: 2713-2717 (1992)] 등 역시 이용되었으며, FimA나 1 형(type 1) 펌브리아(fimbriae)의 FimH 어드헤신(adhesin)과 같은 펌브리아 단백질 [Hedegaard et al., Gene, 85: 115-124 (1989)], PapA 필루(pilu) 서브유닛과 같은 필리(pili) 단백질 등을 세포 표면발현 모

체로 이용하여 외래 단백질의 발현을 시도하기도 하였다. 이 외에도 빙핵활성 단백질(ice nucleation protein) [Jung et al., Nat. Biotechnol, 16: 576-560 (1998), Jung et al., Enzyme Microb. Technol, 22(5): 348-354 (1998), Lee et al., Nat. Biotechnol, 18: 645-648 (2000)], 클레브시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*)의 풀루라나제(pullulanase) [Kornacker et al., Mol. Microb., 4: 1101-1109 (1990)], 니세리아(*Neisseria*)의 IgA 프로테아제[Klauser et al., EMBO J., 9:1991-1999 (1990)] 등이 표면발현 모체로 사용할 수 있다는 보고가 있다. 그람양성균(Gram positive bacteria)을 이용하는 경우에는 스태필로코쿠스 오레우스(*S. aureus*) 유래의 단백질 A를 표면발현 모체로 사용하여 말라리아 항원을 효과적으로 발현시킨 보고가 있으며, 젖산 박테리아의 표면 코트(coat) 단백질을 이용하여 표면 발현에 이용했다는 보고 등 그람 양성 박테리아의 표면 단백질을 모체로 이용했다는 보고가 있다.

<24> 본 발명자들은 바실러스 속 균주 유래의 폴리 감마 글루탐산의 합성 복합체 유전자 (pgsBCA)를 새로운 표면발현 모체로 활용하여, 외래단백질을 미생물의 표면에 효과적으로 발현시키는 새로운 벡터와 상기 벡터로 형질전환된 미생물의 표면에 외래단백질을 다량 발현시키는 방법을 개발한 바 있다 (출원번호 10-2001-48373).

<25> 상기에서 소개된 표면발현 모체들을 이용하여 병원체의 항원 또는 항원 결정기를 유전공학적인 방법을 이용하여 대량 생산이 가능한 세균에서 안정하게 발현시키고자 하는 연구가 많이 시도되었다. 특히 비병원성의 세균 표면에 외래 면역원을 발현시켜 살아있는 상태로 경구투여를 할 경우 종래의 약독화된 병원성 세균이나 바이러스를 이용한 백신들 보다 더 지속적이고 강한 면역반응을 유도할 수 있다고 보고되었다. 이러한 면역반응 유도는 세균의 표면 구조물들이 표면 발현된 외래단백질의 항원성(antigenicity)을 증가시키는 보조제(adjuvant) 작용을 하

기 때문이며 살아있는 상태의 균에 대한 체내의 면역 반응에 의한 것으로 알려져 있다. 이러한 표면발현 시스템을 이용한 비병원성 세균의 재조합 생백신의 개발은 주목할 만하다.

<26> 따라서, 본 발명자들은 바실러스 속 균주 유래의 폴리 감마 글루탐산의 합성 복합체 유전자(pgsBCA)를 표면발현 모체로 활용하여 유전자 및 단백질 분석에 의해 선정된 사스 코로나 바이러스의 항원을 유산균과 같은 비병원성 식품 안전성이 보장된 미생물의 표면에 다량 발현하여 확인하고, 이 미생물을 경구 복용하여 사스 코로나바이러스에 대한 체내 혈중 항체 생성능 및 점막 면역을 유도시키는 보다 경제적이고 안정적인 예방 백신을 개발하기에 이르렀다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<27> 본 발명의 목적은 미생물의 표면발현 시스템을 활용하여 사스 코로나바이러스 항원을 발현할 수 있는 벡터 및 상기 벡터에 의해 형질전환된 미생물을 제공하는데 있다.

<28> 본 발명의 다른 목적은 사스 코로나바이러스의 항원이 표면에 발현된 형질전환된 미생물, 상기 미생물로부터 추출된 사스 코로나바이러스 항원 또는 상기 미생물로부터 정제된 사스 코로나바이러스 항원을 유효성분으로 함유하는 사스 예방용 백신을 제공하는데 있다.

【발명의 구성】

<29> 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 폴리감마글루탐산 합성효소 복합체를 코딩하는 유전자 pgsB, pgsC 및 pgsA 중 어느 하나 또는 둘 이상과, 사스 코로나바이러스의 스파이크(spike) 항원단백질 또는 뉴클레오캡시드(nucleocapsid) 항원단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 표면 발현벡터를 제공한다.

<30> 본 발명에서, 상기 표면 항원단백질 유전자로는 사스 코로나바이러스의 스파이크 항원단백질을 암호화하는 유전자라면 모두 사용될 수 있으며, 사스 코로나바이러스의 스파이크 항원단백질 유전자를 단독으로 이용할 수도 있고, 둘 이상을 복합적으로 이용할 수도 있다. 또한, 상기 폴리감마글루탐산 합성효소 복합체를 코딩하는 유전자에는 pgsA가 포함되는 것이 바람직하다. 상기 스파이크 항원단백질은 SARS SA, SARS SB, SARS SC 또는 SARS SD일 수 있고, 뉴클레오캡시드 항원단백질은 SARS NA 또는 SARS NB일 수 있다.

<31> 본 발명은 또한, 상기 발현벡터로 형질전환된 미생물 및 상기 미생물을 배양하는 것을 특징으로 하는 사스 코로나바이러스의 스파이크 항원단백질 또는 뉴클레오캡시드 항원단백질의 제조방법을 제공한다.

<32> 본 발명에 적용될 수 있는 미생물은, 생체 적용시 독성이 없거나, 약독화된(attenuated) 미생물이라면 어느 것이라도 가능하다. 예를들면, 그람음성균으로 대장균, 살모넬라 타이피, 살모넬라 타이피뮤리움, 비브리오 콜레라, 마이코박테리움 보비스, 시겔라 등을, 그람양성균으로 바실러스, 락토바실러스, 락토코커스, 스테필로코커스, 리스테리아 모노사이토제네스 및 스트렙토코커스 등을 적절히 선택할 수 있다. 유산균과 같이 식용이 가능한 미생물을 선택하는 것이 특히 바람직하다.

<33> 본 발명은 또한, 상기 항원단백질이 표면에 발현된 미생물 자체를 이용하거나, 상기 미생물을 파괴하고 세포막 성분을 조추출한 물질을 이용하거나, 상기 미생물로부터 정제한 항원단백질을 유효성분으로 함유하는 SARS 예방용 백신을 제공한다.

<34> 본 발명에 의한 백신은 사스 코로나바이러스에 의해 유발되는 중증 급성호흡기 증후군의 예방용 의약품으로 이용될 수 있다.

- <35> 본 발명에 의한 백신은, 경구용 또는 식용으로 섭취할 수도 있고, 피하 또는 복강에 주사할 수도 있고, 비강 투여를 할 수 있다.
- <36> 사스 코로나바이러스의 감염은 현재까지 감염성 비말에 의한 호흡기 감염을 통해 이루어지는 것으로 알려져 있어 호흡기 점막 조직 표면 (mucosal surface)에서 일어나는 것으로 추정되므로 점막면역에 의한 감염의 방어는 매우 중요하다. 사스 코로나바이러스의 항원을 표면에 발현하는 미생물은 점막에서의 항체형성 (mucosal response)을 더 효과적으로 유도할 수 있는 장점을 가지고 있어 상기의 형질전환된 미생물 자체를 이용한 경구용 백신 혹은 비강 투여 백신이 비경구용 (parenteral) 백신 보다 사스 코로나바이러스의 방어에 더 효과적일 것으로 기대된다.
- <37> 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- <38> 특히 하기 실시예에서는 사스 코로나바이러스의 스파이크 단백질내 항원성 부위 유전자 및 뉴클레오키프 단백질내 항원성 부위의 유전자를 적용하였으나, 어떠한 항원단백질 유전자를, 단독으로 또는 둘 이상을 복합적으로 이용할 수도 있을 것이다.
- <39> 또한 하기 실시예에서는 바실러스 서브틸리스 청국장(*Bacillus subtilis* var. chungkookjang, KCTC 0697BP)로부터 폴리감마글루탐산 합성에 관여하는 세포외막 단백질의 유전자 pgsBCA를 획득하여 이용하였으나, 유전자는 폴리감마글루탐산을 생산하는 모든 바실러스

속 균주로부터 pgsBCA를 획득하여 제조된 벡터 또는 이 벡터를 이용한 형질전환된 미생물 등도 본 발명의 범위에 포함된다 하겠다. 예컨대, 바실러스 서브틸리스 청국장에 존재하는 pgsBCA 유전자의 염기서열과 80% 이상의 상동성을 갖는 타균주 유래의 pgsBCA 유전자를 사용하여 백신용 벡터를 제조하거나, 이를 이용하는 것도 본 발명의 범위에 포함될 것이다.

<40> 또한, 하기 실시예에서는 유전자 pgsBCA 중에서 pgsA만을 활용하여 표면 발현용 벡터를 제작하였으나, 간접 실시예로부터 유추해 볼 수 있듯이, 유전자 pgsBCA의 전부 또는 일부만을 사용하여 백신용 벡터를 제작하는 것도 본 발명의 범위에 포함될 것이다.

<41> 또한, 하기 실시예에서는, 상기 벡터에 대한 숙주로서, 그람음성 세균인 살모넬라 타이피와 그람양성세균인 락토바실러스만을 사용하였으나, 이 세균 이외에 여하한 그람음성균 또는 그람양성균도 본 발명에 의한 방법으로 형질전환시키면 동일한 결과를 얻을 수 있다는 사실도 당업자에게는 자명할 것이다.

<42> 또한 하기 실시예에서는, 백신용 벡터로 형질전환된 미생물 자체를 생백신으로 생체에 적용한 예만이 제시되어 있다. 그러나, 백신관련 기술분야의 지식으로 보아, 상기 미생물로부터 조추출된 발현단백질(사스 코로나바이러스의 항원단백질) 또는 정제된 발현단백질을 생체에 적용하더라도 동일하거나 유사한 결과를 얻을 수 있음은 당연할 것이다.

<43> 실시예 1 : 사스 코로나바이러스의 스파이크 단백질내 항원성 부위 유전자 합성

<44> 사스 코로나바이러스의 스파이크 단백질은 1256 아미노산으로 구성된 당단백질이다. 많은 연구가 이루어져 있는 다른 코로나바이러스의 경우 스파이크 단백질 대부분이 바이러스 입자 표면을 싸고 있는 외피(envelope) 단백질에 삽입되어져 외부에 노출된 구조를 이루고 있고

이러한 노출 부위 및 항원성 부위가 바이러스 감염을 유도하고, 감염을 막기 위한 백신의 목적 항원으로 그 연구가 많이 이루어져 있다.

<45> 따라서, 사스 코로나바이러스의 스파이크 단백질 1256 아미노산중 사스 코로나바이러스의 항원성을 나타낼 수 있는 부위를 항원성 부위가 많이 연구된 다른 코로나 바이러스인 돼지 전염성 위장염 바이러스(Transmissible Gastroenteritis, TGE Coronavirus)의 스파이크 단백질과의 단백질 비교 분석 및 구조적 비교 분석을 통해 항원성 부위를 선정하고, 이를 합성하였다. 구체적으로 돼지 전염성 위장염 바이러스의 스파이크 단백질의 항원성 부위는 네 부위(A, B, C, D)로 잘 알려져 있다 (Luis Enjuanes, Virology, 183, 225-238, 1991). 이들 부위와 사스 코로나바이러스의 스파이크 단백질과의 관계를 카이트-둘리틀(Kyte-Doolittle) 방법인 친수성 플롯(hydrophilicity plot), 제임슨-울프(Jameson-wolf) 방법인 항원 인덱스 (Antigenic index) 그리고 에미니(Emini) 방법인 표면 확률 플롯(surface probability plot)을 통해 분석 후, 사스 코로나바이러스 Tor2 분리물(isolate)의 스파이크 단백질 염기서열 중 SARS SA, SARS SB, SARS SC 및 SARS SD를 선정하였다 (도 1).

<46> 우선 전체 염기서열이 분석된 사스 코로나바이러스 Tor2 분리물의 스파이크 단백질 염기서열 (21492 - 25259 염기, 1255 아미노산)을 기초로 하여 항원성 부위라 예상되는 두번째 아미노산부터 114번째 아미노산까지 113아미노산 길이 부위를 선택하여 SARS SA라 명명하였고, 375번째 아미노산부터 470아미노산까지의 95아미노산 길이 부위를 선택하여 SARS SB라 명명하였고, 510번째 아미노산부터 596번째 아미노산까지의 87아미노산 길이 부위를 선택하여 SARS SC라 명명하였으며, 1117아미노산부터 1197아미노산까지의 81아미노산 길이 부위를 선택하여 SARS SD라 명명하였다. 이들 항원성 부위들 중 SARS SA와 SARS SC 부위의 유전자를 합성하였다.

<47> 먼저 SARS SA라 명명한 113길이의 아미노산에 해당되는 유전자를 합성하기 위해서 하기 서열 1 내지 8의 프라이머를 이용한 중합 효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 수행하여, 증폭된 339bp의 SARS SA 유전자 부위를 수득하였다.

<48> 서열 1 : 5' - gga tcc ttt att ttc tta tta ttt ctt act ctc act agt ggt agt gac ctt
gac cg - 3'

<49> 서열 2 : 5' - tga gtg taa tta gga gct tga aca tca tca aaa gtg gta caa cgg tca agg
tc - 3'

<50> 서열 3 : 5' - aat tac act caa cat act tca tct atg cgt ggg gtt tac tat cct gat gaa
att ttt c - 3'

<51> 서열 4 : 5' - aaa atg gaa gaa ata aat cct gag tta aat aaa gag tgt ctg aac gaa aaa
ttt - 3'

<52> 서열 5 : 5' - ctt cca ttt tat tct aat gtt act ggg ttt cat act att aat cat acg ttt
ggc aac - 3'

<53> 서열 6 : 5' - ggc agc aaa ata aat acc atc ctt aaa agg aat gac agg gtt gcc aaa cgt
atg - 5'

<54> 서열 7 : 5' - att tat ttt gct gcc aca gag aaa tca aat gtt gtc cgt ggt tgg gtt ttt
gg - 3'

<55> 서열 8 : 5' - ggt acc aag ctt att aca cag act gtg act tgt tgt tca tgg tag aac caa
aaa ccc - 3'

<56> SARS SC라 명명한 87 길이의 아미노산에 해당되는 유전자를 합성하기 위해서 하기 서열 9 내지 14의 염기서열을 갖는 프라이머를 이용한 PCR을 수행하여, 증폭된 261bp의 SARS SC 유전자를 수득하였다.

<57> 서열 9 : 5' - gga tcc gtt tgt ggt cca aaa tta tct act gac ctt att aag aac cag tgt gtc aat - 3'

<58> 서열 10 : 5' - gaa gaa gga gtt aac aca cca gta cca gtg aga cca tta aaa tta aaa ttg aca cac t - 3'

<59> 서열 11 : 5' - aac tcc ttc ttc aaa gcg ttt tca acc att tca aca att tgg ccg tga tgt ttc tga - 3'

<60> 서열 12 : 5' - cta aaa ttt cag atg ttt tag gat cac gaa cag aat cag tga aat cag aaa cat - 3'

<61> 서열 13 : 5' - ctg aaa ttt tag aca ttt cac ctt gtg ctt ttg ggg gtg taa gtg taa tta ca - 3'

<62> 서열 14 : 5' - ggt acc aag ctt att aaa cag caa ctt cag atg aag cat ttg tac cag gtg taa tta t - 3'

<63> 실시예 2 : 사스 코로나바이러스의 뉴클레오캡시드 단백질내 항원성 부위 유전자 합성

- <64> 사스 코로나바이러스의 뉴클레오캡시드 단백질은 422 아미노산으로 구성된 단백질이다. 많은 연구가 이루어져 있는 다른 코로나바이러스의 경우 뉴클레오캡시드 단백질 대부분이 항원으로 작용된다는 보고가 있고 이 부위를 감염을 막기 위한 백신의 목적 항원으로 그 연구가 많이 이루어져 있다.
- <65> 사스 코로나바이러스의 뉴클레오캡시드 단백질 아미노산중 사스 코로나바이러스의 항원성을 나타낼 수 있는 부위를 다른 코로나 바이러스인 돼지 전염성 위장염 바이러스 (Transmissible Gastroenteritis, TGE Coronavirus)의 뉴클레오캡시드 단백질과의 비교분석을 통해 항원성 부위를 선정하여 합성하였다.
- <66> 구체적으로 돼지 전염성 위장염 바이러스의 뉴클레오캡시드 단백질과 사스 코로나바이러스의 뉴클레오캡시드 단백질과의 관계를 카이트-둘리틀 방법인 친수성 플롯, 제임슨-울프 방법인 항원 인덱스 그리고 에미니 방법인 표면 확률 플롯을 통해 분석한 후, 사스 코로나바이러스 Tor2 분리물의 뉴클레오캡시드 단백질 염기서열 중 SARS NA 및 SARS NB를 선정하였다 (도 2).
- <67> 우선 전체 염기서열이 분석된 사스 코로나바이러스 Tor2 분리물의 뉴클레오캡시드 단백질 염기 서열 (28120 - 29388 염기, 422 아미노산)을 기초로 하여 항원성 부위라 예상되는 두 번째 아미노산부터 157아미노산까지의 156아미노산 길이 부위를 선택하여 SARS NA라 명명하였고, 163아미노산부터 305번째 아미노산까지의 143아미노산 길이 부위를 선택하여 SARS NB라 명명하였으며 본 발명에서는 SARS NB 부위의 유전자를 합성하였다.
- <68> SARS NB라 명명한 143 길이의 아미노산에 해당되는 유전자를 합성하기 위해서 하기 서열 15 내지 24의 염기서열을 프라이머를 이용한 PCR을 수행하여, 증폭된 429bp의 SARS NB의 유전자 부위를 수득하였다.

- <69> 서열 15 : 5' - gga tcc cct caa ggt aca aca ttg cca aaa ggc ttc tac gca gag ggt agc
cgt gg - 3'
- <70> 서열 16 : 5' - acc acg act acg tga tga aga acg aga aga ggc ttg act gcc gcc acg gct
acc - 3'
- <71> 서열 17 : 5' - cac gta gtc gtg gta att cac gta att caa ctc ctg gca gca gtc gtg gta
at - 3'
- <72> 서열 18 : 5' - gcg agg gca gtt tca cca cca ccg cta gcc ata cga gca gga gaa tta cca
cga - 3'
- <73> 서열 19 : 5' - gaa act gcc ctc gca ctt ttg ctg ctt gac cgt ttg aac cag ctt gag agc
aa - 3'
- <74> 서열 20 : 5' - tag tga cag ttt gac ctt gtt gtt gtt ggc ctt tac cag aaa ctt tgc tct
caa - 3'
- <75> 서열 21 : 5' - caa act gtc act aag aaa tct gct gct gag gca tct aaa aag cct cgt caa
aaa cgt - 3'
- <76> 서열 22 : 5' - gga cca cga cgc cca aat gct tga gtg acg ttg tac tgt ttt gtg gca gta
cgt ttt tg - 3'
- <77> 서열 23 : 5' - ggg cgt cgt ggt cca gaa caa acc caa ggt aat ttc ggg gac caa gac ctt
atc cgt - 3'

<78> 서열 24 : 5' - ggt acc aag ctt att aaa ttt gcg gcc aat gtt tgt aat cag tac ctt gac
gga taa gg - 3'

<79> 실시예 3 : 표면발현용 전환 벡터 pHCE2LB:pgsA:SARS SA의 제작

<80> 바실러스 속 균주에서 유래한 폴리 감마 글루탐산 합성에 관여하는 세포외막 단백질의 유전자(pgsBCA) 중 pgsA를 이용하여 그람 음성 미생물 및 그람 양성 미생물을 숙주로 하여 사스 코로나바이러스의 스파이크 단백질내 항원성 부위 SARS SA를 표면발현할 수 있는 벡터 pHCE2LB:pgsA-SARS SA를 제작하였다.

<81> 우선, 인간 파필로마바이러스의 L1 항원을 그람 음성 및 그람 양성 미생물을 숙주로 하는 표면 발현용 벡터 (그람 음성 및 그람 양성 범용 벡터인 pAT에 항시적 고발현 프로모터인 HCE 프로모터, 폴리 감마 글루탐산 합성에 관여하는 세포외막 단백질의 유전자(pgsBCA) 중 pgsA 그리고 HPV L1을 포함하는 전환벡터)에 사스 코로나바이러스의 스파이크 단백질내 항원성 부위 SARS SA를 도입하기 위하여 pHCE2LB:pgsA-HPVL1(KCTC 10349BP)을 BamH I과 KpnI으로 절단하여 HPVL1 유전자를 제거하여 표면 발현용 벡터 pHCE2LB:pgsA를 준비하였다.

<82> 상기 실시예 1에서 합성된 SARS SA 항원 유전자를 제한효소 BamH I과 KpnI으로 절단하여 미리 준비된 표면발현용 벡터 pHCE2LB:pgsA의 폴리 감마 글루탐산 합성에 관여하는 세포외막 단백질의 유전자 pgsA의 C-말단 부위에 번역코돈을 맞추어 연결하여 전환 벡터 pHCE2LB:pgsA-SARS SA (도 3a)를 제작하였다.

- <83> 제작된 표면발현용 벡터 pHCE2LB:pgsA-SARS SA를 이용하여 그람양성 세균인 락토바실러스에 형질전환시킨 후 락토바실러스 내의 pHCE2LB:pgsA-SARS SA 플라스미드의 존재를 확인하였다.
- <84> 실시예 4 : 표면발현용 전환 벡터 pHGE2LB:pgsA:SARS SC의 제작
- <85> 바실러스 속 균주에서 유래한 폴리 감마 글루탐산 합성에 관여하는 세포외막 단백질의 유전자(pgsBCA) 중 pgsA를 이용하여 그람음성 미생물 및 그람 양성 미생물을 숙주로 하여 사스코로나바이러스의 스파이크 단백질내 항원성 부위 SARS SC를 표면발현할 수 있는 벡터 pHCE2LB:pgsA-SARS SC를 제작하였다.
- <86> 우선, 상기 실시예 3에서 제작된 표면발현용 벡터 pHCE2LB:pgsA-SARS SA를 이용하여 사스코로나바이러스의 스파이크 단백질내 항원성 부위 SARS SC를 도입하기 위하여 pHCE2LB:pgsA-SARS SA을 BamH I과 KpnI으로 절단하여 SARS SA 유전자를 제거하여 pHCE2LB:pgsA 표면 발현용 벡터를 준비하였다.
- <87> 상기 실시예 1에서 합성된 SARS SC 항원 유전자를 제한효소 BamH I과 KpnI으로 절단하여 준비된 표면발현용 벡터 pHCE2LB:pgsA의 폴리 감마 글루탐산 합성에 관여하는 세포외막 단백질의 유전자 pgsA의 C-말단 부위에 번역코돈을 맞추어 연결하여 전환 벡터 pHCE2LB:pgsA-SARS SC (도 3b)를 제작하였다.
- <88> 제작된 표면발현용 벡터 pHCE2LB:pgsA-SARS SC를 이용하여 그람양성 세균인 락토바실러스에 형질전환시킨 후 락토바실러스내의 pHCE2LB:pgsA-SARS SA 플라스미드의 존재를 확인하였다.

<89> 실시예 5 : 표면발현용 전환 벡터 pHCE2LB:pgsA:SARS NB의 제작

<90> 바실러스 속 균주에서 유래한 폴리 감마 글루탐산 합성에 관여하는 세포외막 단백질의 유전자(pgsBCA) 중 pgsA를 이용하여 그람음성 미생물 및 그람 양성 미생물을 숙주로 하여 사스 코로나바이러스의 뉴클레오캡시드 단백질내 항원성 부위 SARS NB를 표면발현할 수 있는 벡터 pHCE2LB:pgsA-SARS NB를 제작하였다.

<91> 우선, 상기 실시예 3에서 제작된 표면발현용 벡터 pHCE2LB:pgsA-SARS SA를 이용하여 사스 코로나바이러스의 뉴클레오캡시드 단백질내 항원성 부위 SARS NB를 도입하기 위하여 pHCE2LB:pgsA-SARS SA을 BamH I과 KpnI으로 절단하여 SARS SA 유전자를 제거하여 표면 발현용 벡터 pHCE2LB:pgsA를 준비하였다.

<92> 상기 실시예 2에서 합성된 SARS NB 항원 유전자를 제한효소 BamH I과 KpnI으로 절단하여 준비된 표면발현용 벡터 pHCE2LB:pgsA의 폴리 감마 글루탐산 합성에 관여하는 세포외막 단백질의 유전자 pgsA의 C-말단 부위에 번역코돈을 맞추어 연결하여 전환 벡터 pHCE2LB:pgsA-SARS NB(도 4)를 제작하였다.

<93> 제작된 표면발현용 벡터 pHCE2LB:pgsA-SARS NB를 이용하여 그람양성 세균인 락토바실러스에 형질전환시킨 후 락토바실러스내의 pHCE2LB:pgsA-SARS NB 플라스미드의 존재를 확인하였다.

<94> 간접실시예

<95> 바실러스 속 균주에서 유래한 폴리 감마 글루탐산 합성에 관여하는 세포외막 단백질 유전자(pgsBCA)를 이용하여, 본 발명에 의한 사스 코로나바이러스 항원단백질은 아니지만, 코로나바이러스의 일종으로 돼지의 전염성 소화기 질병을 유발하는 전염성 위장염 바이러스(Transmissible Gastroenteritis virus, TGE) 및 돼지의 전염성 설사병 바이러스(Porcine Epidemic Diarrhea virus, PED)의 스파이크 당단백질 및 뉴클레오캡시드 단백질의 항원성 부위를 대상으로 항원성 부위를 코딩하는 유전자를 선택한 후, 이 유전자가 포함된 표면발현용 벡터 제작하여, 이 벡터로 미생물을 형질전환한 다음, 상기 형질전환된 미생물에서 상기 항원단백질이 발현됨을 확인하였다. 또한, 상기 형질전환된 미생물이 돼지 전염성 위장염 바이러스 및 전염성 설사병 바이러스의 예방용 백신으로 사용할 수 있음을 임상실험을 통해 간접적으로 확인하였다

<96> 간접 실시예 1 : 표면 발현용 전환 벡터 pHCE2LB:pgsA-TGEN1의 제조 및 TGE N 항원의 표면발현

<97> 우선, 범용 클로닝 벡터인 pUC8에 클론되어 있는 약 1.1 kb의 TGE 바이러스 유전자(한국 등록특허 0138395)를 주형으로 사용하고, 하기 서열 25 및 26의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하여, 돼지의 전염성 소화기 질병을 유발하는 돼지의 전염성 위장염 바이러스(Transmissible Gastroenteritis virus, TGE virus)의 뉴클레오단백질 (nucleoprotein: N) 항원 중 항원성 부위인 TGE N1 항원 유전자를 증폭하였다. 이때 증폭된 유전자 부위는 415bp 크기였다.

<98> 서열 25 : 5-cg gga tcc gcc aac cag gga caa cg -3

<99> 서열 26 : 5-ccc aag ctt tta tgg att cat tat tag c-3

<100> 상기 서열 25 및 26의 프라이머는 표면 발현용 벡터 pHCE2LB:pgsA에 존재하는 제한효소 BamH I과 KpnI 인식부위가 존재하도록 구성되었다.

<101> 상기 증폭된 TGE 바이러스 N1 항원 유전자를 제한효소 BamH I, KpnI으로 절단하여, 실시예 3에서 준비한 표면 발현용 벡터 pHCE2LB:pgsA의 세포외막 단백질 유전자 (pgsA)의 C-말단 부위에 번역코돈을 맞추어 연결하였다. 이렇게 제조한 전환 벡터 pHCE2LB:pgsA-TGEN1을 도 5a에 나타내었다.

<102> 상기 표면 발현용 벡터 pHCE2LB:pgsA-TGEN1로 락토바실러스를 형질전환 시킨 후, TGE 바이러스의 N1 항원단백질 발현을 조사하였다.

<103> 폴리 감마 글루탐산을 합성하는 유전자 pgsA의 C-말단과 융합된 TGE N1항원의 세균 발현은 pHCE2LB:pgsA-TGEN1으로 형질전환된 락토바실러스 카제이를 MRS배지(Lactobacillus MRS, Becton Dickinson and Company Sparks, USA), 37℃에서 정체 배양, 증식시킴으로 표면발현을 유도하였다.

<104> SDS-폴리아크릴아미드 젤 전기영동 및 pgsA 및 TGEN1에 대한 특이 항체를 이용한 웨스턴 면역블롯팅(western immunoblotting)을 수행하여 상기 TGEN1의 발현을 확인하였다. 구체적으로 발현이 유도된 락토바실러스 카제이를 동일한 세포 농도에서 얻은 단백질로 디네이처(denature)시켜 시료를 준비하고, 이를 SDS-폴리아크릴아미드 젤 전기영동으로 분석한 다음 분획된 단백질들을 PVDF (polyvinylidene -difluoride membranes, Bio-Rad) 멤브레인에 옮겼다. 단백질들이 옮겨진 PVDF 멤브레인을 블로킹 완충용액 (50 mM 트리스 염산, 5 % 스킴 밀크(skim

milk), pH 8.0)에서 1시간 동안 흔들어 블로킹시킨 다음, pgsA 및 TGEN1에 대한 토끼 유래의 폴리클론 1차 항체를 블로킹 완충용액에 1000배 희석하여 12시간 동안 반응시켰다.

<105> 반응이 끝난 멤브레인은 완충용액으로 세척하고 바이오틴이 접합된 토끼에 대한 2차 항체를 블로킹 완충용액에 1000배 희석하여 4시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 멤브레인은 완충용액으로 세척하고 아비딘-바이오틴(avidin-biotin)시약을 1시간 동안 반응시켜 다시 세척하였다. 세척된 멤브레인에 기질과 발색시약으로 H_2O_2 와 DAB 용액을 첨가하여 발색시키고 TGEN에 대한 특이 항체와 상기 융합단백질간의 특이적인 결합을 확인하였다(도 5b).

<106> 도 5b의 레인 1은 형질전환되지 않은 숙주세포인 락토바실러스 카제이, 레인 2와 3은 형질전환된 pHCE2LB:pgsA-TGEN1/락토바실러스 카제이이다.

<107> 도 5b에서 보는 바와 같이, pHCE2LB:pgsA-TGEN1 플라스미드에 의해서 약 57 KDa의 융합단백질 밴드를 확인할 수 있었다.

<108> 간접 실시예 2 : 표면 발현용 전환 벡터 pHCE2LB:pgsA-PEDN의 제조 및 PED N 항원의 표면발현

<109> 실시예 3에서 제작된 표면 발현용 벡터 pHCE2LB:pgsA에 PED 바이러스의 N 항원 유전자를 나타내는 부위를 도입하기 위하여, 범용 클로닝 벡터인 pUC8에 클론되어 있는 약 1.3 kb의 PED 바이러스 유전자(한국등록특허 0138395)를 주형으로 사용하고, 하기 서열 27 및 28의 염기서열을 갖는 프라이머를 이용한 PCR을 수행하여

돼지의 전염성 소화기 질병을 유발하는 돼지의 전염성 설사병 바이러스 (Porcine Epidemic Diarrhea virus, PED)의 뉴클레오단백질(nucleoprotein : N) 항원 유전자를 증폭하였다. 이때 증폭된 유전자 부위는 1326bp 크기였다.

<110> 서열 27 : 5-cg gga tcc gct tct gtc agc ttt cag g-3

<111> 서열 28 : 5-ccc aag ctt tta att tcc tgt atc gaa ga-3

<112> 상기 서열 27 및 서열 28의 프라이머는 표면 발현용 벡터 pHCE2LB:pgsA에 존재하는 제한 효소 BamH I과 Hind III 인식부위가 존재하도록 구성되었다.

<113> 상기 증폭된 PED 바이러스 N 항원 유전자를 제한효소 BamH I, Hind III로 절단하여 실시 예 3에서 준비한 표면 발현용 벡터 pHCE2LB:pgsA의 세포외막 단백질 유전자 (pgsA)의 C-말단 부위에 번역코돈을 맞추어 연결하였다. 이렇게 제작한 전환벡터 pHCE2LB:pgsA-PEDN을 도 6a에 나타내었다.

<114> 상기 표면 발현용 벡터 pHCE2LB:pgsA-PEDN로 이용한 대장균 및 락토바실러스를 형질전환 하여 PED 바이러스의 N 항원의 발현을 조사하였다. 이를 위해 상기 형질전환된 대장균 및 락토 바실러스를 배양하여 간접실시에 1에서와 동일한 과정으로 발현을 유도한 다음 세포외막 단백질 pgsA와 융합된 PED N 항원이 대장균 및 락토바실러스에서 발현되었음을 SDS-폴리아크릴아미 드 젤 전기영동 및 PED N항원에 대한 항체와 pgsA에 대한 항체를 이용한 웨스턴 면역블롯팅 (western immunoblotting)을 수행하여 확인하였다(도 6b).

- <115> 도 6b의 라인 1은 형질전환되지 않은 숙주세포인 락토바실러스 카제이, 라인 2는 형질전환된 pHCE2LB:pgsA-PEDN/락토바실러스 카제이이다.
- <116> 도 6b에서 보는 바와 같이, pHCE2LB:pgsA-PEDN 플라스미드에 의해서 약 90 KDa의 융합 단백질 밴드를 확인 할 수 있었다.
- <117> 간접 실시예 3 : TGE 바이러스 및 PED 바이러스의 N 항원을 표면에 발현하는 락토바실러스의 생백신 효과
- <118> 상기 간접 실시예 1 및 2의 표면 발현용 전환벡터 pHCE2LB:pgsA-TGEN1 또는 pHCE2LB:pgsA-PEDN로 형질전환된 락토바실러스 카제이를 배양하여, 상기 각 항원을 락토바실러스에서 표면발현을 유도한 다음, 폴리감마글루탐산 합성에 관여하는 세포외막단백질 pgsA와 융합된 TGE 바이러스의 N 항원 및 PED 바이러스의 N 항원 각각의 항원성을 조사하였다.
- <119> 표면발현 전환벡터 pHCE2LB:pgsA-TGEN1 또는 pHCE2LB:pgsA-PEDN로 형질전환된 락토바실러스 카제이를 배양하여, 각각 동일한 세균농도가 되도록 수확한 세포를 완충용액 (PBS buffer, pH7.4)으로 여러 번 세척을 하고, 각각의 N 항원이 표면발현된 락토바실러스 5×10^9 균을 4-6주령의 BALB/c 마우스의 구강으로 1일 간격으로 세 번 그리고 1주 뒤에 역시 1일 간격으로 세 번 투여 후 처음 투여부터 4주 뒤에 각각의 마우스군 혈청을 취하여 혈청내 각각의 N 항원에 대한 IgG 항체 생성을 각각의 N 항원을 가지고 수행한 웨스턴 블롯팅으로 확인하였다(도 7a, 7b).
- <120> 그 결과로 나타나는 도 7a는 혈청내 TGE N 항원에 대한 IgG 항체가를 나타내는 그래프로 ▼은 pHCE2LB:pgsA-TGEN1로 형질전환된 락토바실러스를 경구투여한 마우스군, ▽은

pHCE2LB:pgsA-TGEN1로 형질전환된 락토바실러스를 비강투여한 마우스군, ○은 pHCE2LB로 형질전환된 락토바실러스를 경구투여한 마우스군 그리고 ●은 락토바실러스를 경구투여한 마우스군의 항체가이다.

<121> 또한, 도 7b에서 보는 바와 같이, 마우스 실험에서 혈청내 PED N 항원에 대한 IgG 항체를 나타내는 그래프로 ▼은 pHCE2LB:pgsA-PEDN으로 형질전환된 락토바실러스를 경구투여한 마우스군, ▽은 pHCE2LB:pgsA-PEDN으로 형질전환된 락토바실러스를 비강투여한 마우스군, ○은 pHCE2LB로 형질전환된 락토바실러스를 경구투여한 마우스군 그리고 ●은 락토바실러스를 경구투여한 마우스군의 항체가이다.

<122> 도 7에서 볼 수 있는 바와 같이, pHCE2LB:pgsA-TGEN1 및 pHCE2LB:pgsA-PEDN으로 형질전환된 락토바실러스를 경구 및 비강으로 투여한 마우스의 혈청에서 각각의 N 항원에 대한 IgG 항체가 대조군에 비해 상당히 높게 나타났음이 확인되었다. 따라서 TGE 및 PED의 N 항원이 표면발현된 미생물(유산균)은 생백신으로서 효과적으로 작용할 수 있음을 알 수 있다.

【발명의 효과】

<123> 본 발명에 따른 사스 유발 코로나바이러스의 항원단백질을 표면 발현하는 형질전환 미생물 및 상기 미생물로부터 추출정제된 항원단백질은 사스의 치료용 또는 예방용 백신으로 활용할 수 있다. 특히, 본 발명의 사스 코로나바이러스 항원을 발현하는 재조합 균주는 경구 백신을 경제적으로 생산할 수 있는 장점을 가진다.

<124> 본 발명의 단순한 변형 내지 변경은 이 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의하여 용이하게 이용될 수 있으며, 이러한 변형이나 변경은 모두 본 발명의 영역에 포함되는 것으로 볼 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

폴리감마글루탐산 합성효소 복합체를 코딩하는 유전자 pgsB, pgsC 및 pgsA 중 어느 하나 또는 둘 이상과, 사스 코로나바이러스의 스파이크(spike) 항원단백질 또는 뉴클레오캡시드(nucleocapsid) 항원단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 표면 발현벡터.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 스파이크 항원단백질은 SARS SA, SARS SB, SARS SC 또는 SARS SD인 것을 특징으로 하는 발현벡터.

【청구항 3】

제1항에 있어서, 뉴클레오캡시드 항원단백질은 SARS NA 또는 SARS NB인 것을 특징으로 하는 발현벡터.

【청구항 4】

제2항에 있어서, pHCE2LB:pgsA:SARS SA 또는 pHCE2LB:pgsA:SARS SC인 것을 특징으로 하는 발현벡터.

【청구항 5】

제3항에 있어서, pHCE2LB:pgsA:SARS NB인 것을 특징으로 하는 발현백터.

【청구항 6】

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 발현백터로 형질전환된 미생물.

【청구항 7】

제6항에 있어서, 상기 미생물은 대장균, 살모넬라 타이피, 살모넬라 타이피뮤리움, 비브리오 콜레라, 마이코박테리움 보비스, 시젤라, 바실러스, 유산균, 스테필로코커스, 리스테리아 모노사이토제네스 및 스트렙토코커스로 이루어지는 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 형질전환된 미생물.

【청구항 8】

제6항의 미생물을 배양하는 것을 특징으로 하는 사스 코로나바이러스의 스파이크 항원단백질 또는 뉴클레오캡시드 항원단백질의 제조방법.

【청구항 9】

제8항의 방법에 의해 수득된 항원단백질을 유효성분으로 함유하는 SARS 바이러스 예방용 백신.

【청구항 10】

제9항에 있어서, 상기 항원단백질은 미생물표면에 발현된 형태이거나, 조추출된 형태 또는 정제된 형태인 것을 특징으로 하는 백신.

【청구항 11】

제9항에 있어서, 경구용 투여 또는 식용 섭취가 가능한 것을 특징으로 하는 백신.

【청구항 12】

제9항에 있어서, 피하 또는 복강 주사용인 것을 특징으로 백신.

【청구항 13】

제9항에 있어서, 비강 투여용인 것을 특징으로 백신.

【청구항 14】

제8항에 있어서, 미생물은 유산균인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 15】

제14항의 방법에 의해 제조되고, 사스 코로나바이러스의 스파이크 항원단백질 또는 뉴클레오펜시드 항원단백질이 표면에 발현된 유산균.

【청구항 16】

제15항의 유산균, 상기 유산균으로부터 추출된 항원단백질 또는 상기 유산균으로부터 정제된 항원단백질을 유효성분으로 함유하는 사스 예방용 백신.

【청구항 17】

제16항에 있어서, 경구용 투여 또는 식용 섭취가 가능한 것을 특징으로 하는 백신.

【청구항 18】

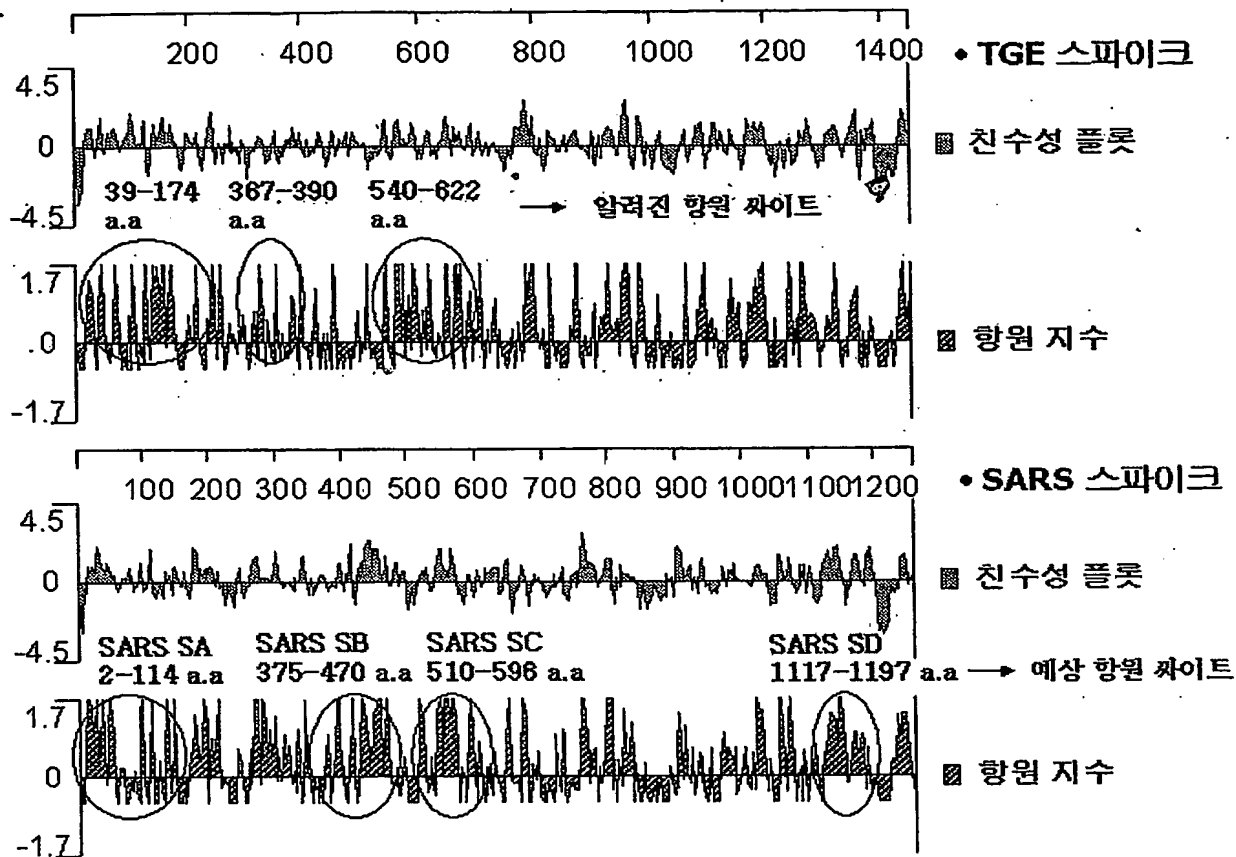
제16항에 있어서, 피하 또는 복강 주사용인 것을 특징으로 백신.

【청구항 19】

제16항에 있어서, 비강 투여용인 것을 특징으로 백신.

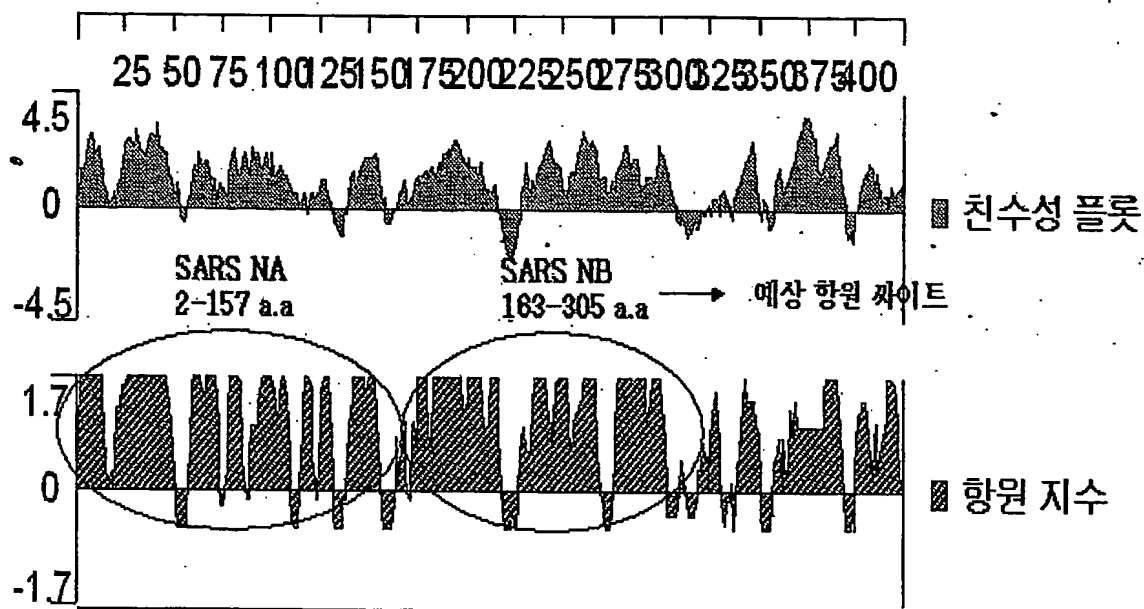
【도면】

【도 1】

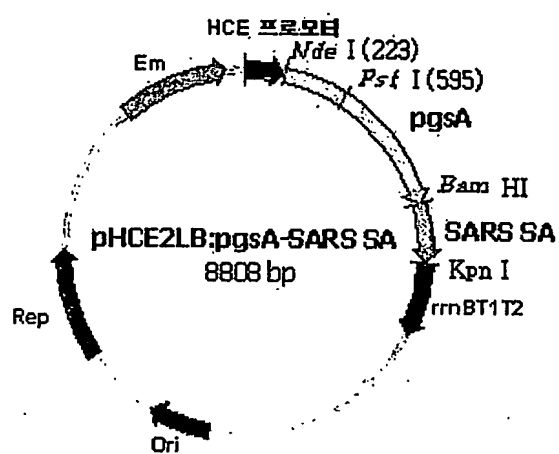


【도 2】

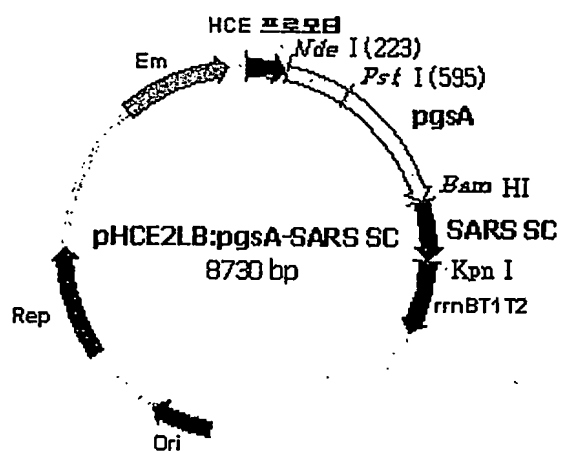
• SARS 뉴클레오타이드



【도 3】

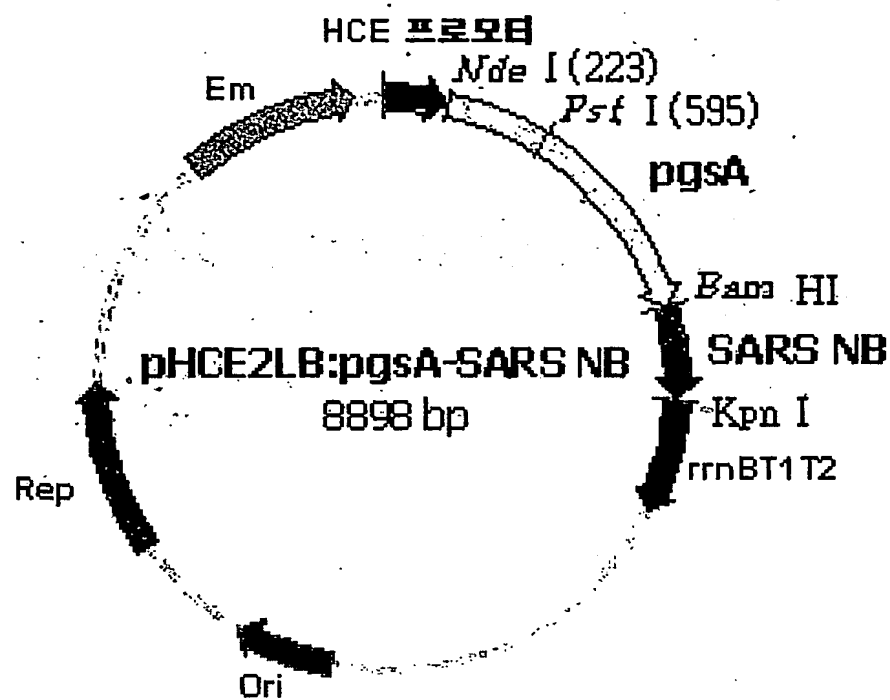


도 3a

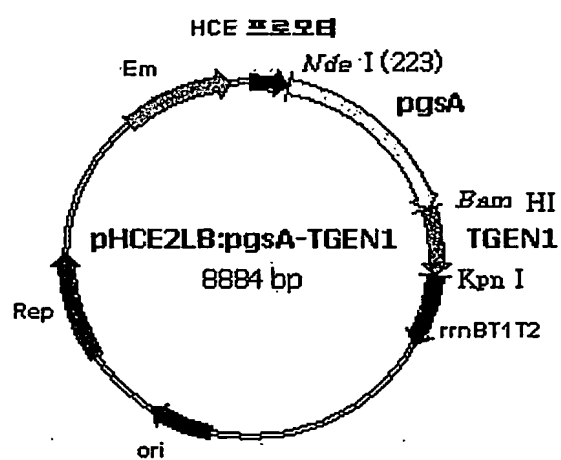


도 3b

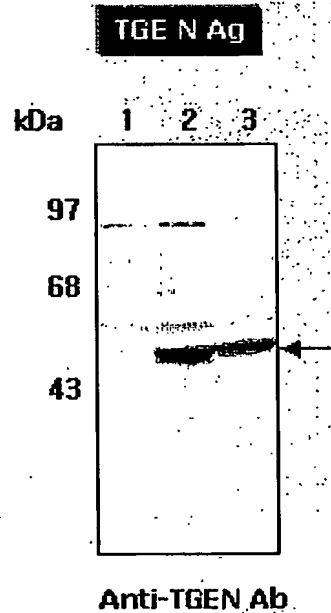
【도 4】



【도 5】

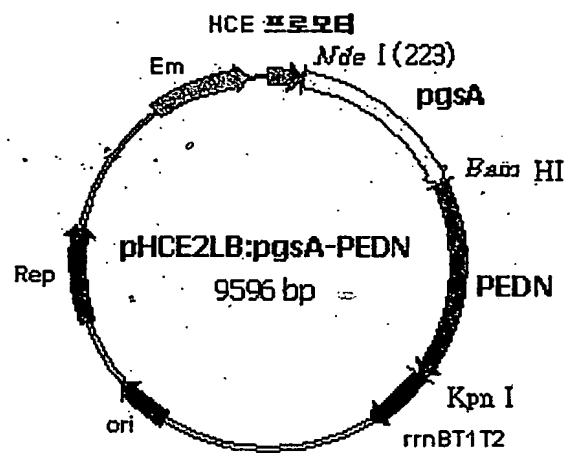


도 5a

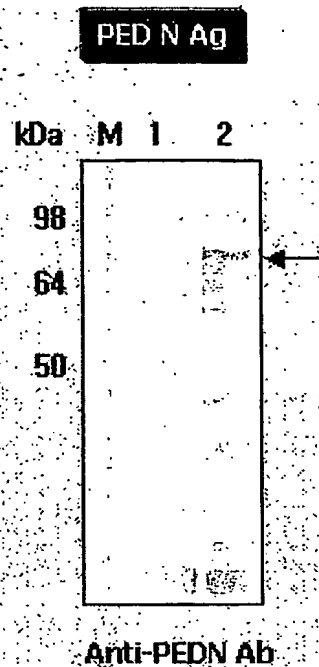


도 5b

【도 6】

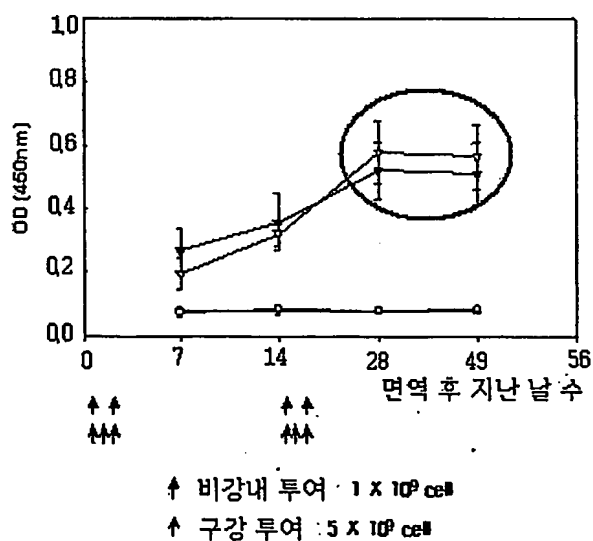


도 6a

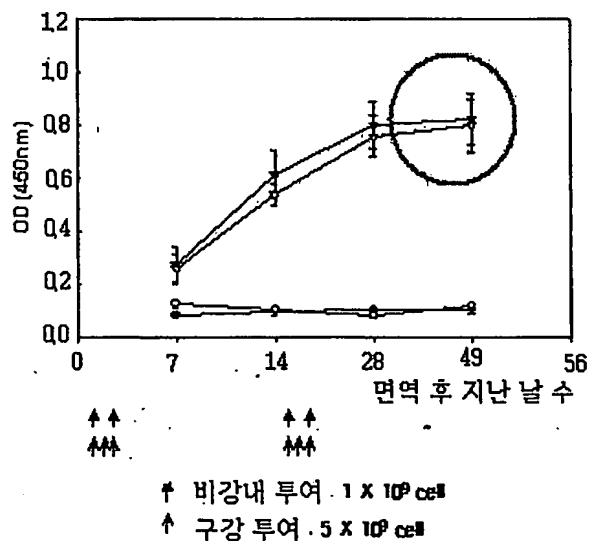


도 6b

【도 7】



도 7a



도 7b

【서열목록】

<110> BioLeaders <120> Cell Surface Expression Vector of SARS Virus Antigen and
Microorganisms Transformed Thereof <130> P03-093 <160> 28 <170> KopatentIn 1.71 <210> 1 <211>
56 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> PCR primer <400> 1 ggatccttta ttttcttatt
atttcttact ctactagtgt gtagtgacct tgatcgt 56 <210> 2 <211> 53 <212> DNA <213>
Artificial Sequence <220> <223> PCR primer <400> 2 tgagtgtaat taggagcttg aacatcatca aaagtgtac
aacggtcaag gtc 53 <210> 3 <211> 58 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <
223> PCR primer <400> 3 aattacactc aacatacttc atctatgcgt ggggtttact atcctgatga aatttttc 58
<210> 4 <211> 54 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> PCR primer <400> 4
aaaatggaag aaataaatcc tgagttaaatt aaagagtgtc tgaacgaaaa attt 54 <210> 5 <211> 57 <212>
DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> PCR primer <400> 5 cttccatttt attctaattgt tactgggttt
catactatta atcatagttt tggcaac 57 <210> 6 <211> 54 <212> DNA <213> Artificial
Sequence <220> <223> PCR primer <400> 6 ggcagcaaaa taaataccat ccttaaaagg aatgacaggg ttgcaaacg tatg
54 <210> 7 <211> 53 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> PCR primer <400> 7
atttattttg ctgccacaga gaaatcaaatt gttgtccgtg gttgggtttt tgg 53 <210> 8 <211> 57 <212>
DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> PCR primer <400> 8 ggtaccaagc ttattacaca gactgtgact
tgtttgtcat ggtagaacca aaaaccc 57 <210> 9 <211> 57 <212> DNA <213> Artificial
Sequence <220> <223> PCR primer <400> 9 ggatccgttt gtggtccaaa attatctact gaccttatta agaaccagt
tgtcaat 57 <210> 10 <211> 58 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> PC
primer <400> 10 gaagaaggag ttaacacacc agtaccagt agaccattaa aattaaaatt gacacact 58 <210> 1
<211> 57 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> PCR primer <400> 11 aactccttct
tcaaagcgtt ttcaaccatt tcaacaattt ggccgtgatg tttctga 57 <210> 12 <211> 54 <212> DNA
<213> Artificial Sequence <220> <223> PCR primer <400> 12 ctaaaatttc agatgtttta ggatcacgaa
cagaatcagt gaaatcagaa acat 54 <210> 13 <211> 53 <212> DNA <213> Artificial
Sequence <220> <223> PCR primer <400> 13 ctgaaatttt agacatttca ctttgtgctt ttgggggtgt aagtgttaatt aca

53 <210> 14 <211> 58 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> PCR primer <400> 1
 ggtaccaagc ttattaaaca gcaacttcag atgaagcatt tgtaaccaggt gtaattac 58 <210> 15 <211> 56 <212>
 DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> PCR primer <400> 15 ggatcccctc aagtacaac attgccaaaa
 ggcttctacg cagagggtag ccgtgg 56 <210> 16 <211> 54 <212> DNA <213> Artificial
 Sequence <220> <223> PCR primer <400> 16 accacgacta cgtgatgaag aacgagaaga ggcttgactg ccgccacggc tacc
 54 <210> 17 <211> 53 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> PCR primer <400> 1
 cacgtagtcg tggtaatca cgttaattcaa ctctggcag cagtcgtggt aat 53 <210> 18 <211> 54 <212>
 DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> PCR primer <400> 18 gcgagggcag tttcaccacc accgctagcc
 atacgagcag gagaattacc acga 54 <210> 19 <211> 53 <212> DNA <213> Artificial
 Sequence <220> <223> PCR primer <400> 19 gaaactgccc tcgcactttt gctgcttgac cgtttgaacc agcttgagag caa
 53 <210> 20 <211> 54 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> PCR primer <400> 2
 tagtgacagt ttgacctgt tgtgttggc cttaccaga aactttgctc tcaa 54 <210> 21 <211> 57 <212>
 DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> PCR primer <400> 21 caaactgtca ctaagaaatc tgctgctgag
 gcatctaaaa agcctcgta aaaacgt 57 <210> 22 <211> 59 <212> DNA <213> Artificial
 Sequence <220> <223> PCR primer <400> 22 ggaccacgac gcccaaatgc ttgagtgcg ttgtactgtt ttgtggcagt
 acgtttttg 59 <210> 23 <211> 57 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> PC
 primer <400> 23 gggcgtcgtg gtccagaaca aaccaaggt aatttcgggg accaagacct tatccgt 57 <210> 2
 <211> 59 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> PCR primer <400> 24 ggtaccaagc
 ttattaaatt tgcggccaat gtttgaatc agtacctga cggataagg 59 <210> 25 <211> 25 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence <220> <223> PCR primer <400> 25 cgggatccgc caaccaggga caacg
 25 <210> 26 <211> 28 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> PCR primer <400> 2
 cccaagcttt tatggattca ttattagc 28 <210> 27 <211> 27 <212>
 DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> PCR primer <400> 27 cgggatccgc ttctgtcagc tttcagg
 27 <210> 28 <211> 29 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> PCR primer <400>
 28 cccaagcttt taatttcctg tatcgaaga 29

【서지사항】

【서류명】 서지사항 보정서
 【수신처】 특허청장
 【제출일자】 2004.02.13

【제출인】

【명칭】 (주)바이오리더스

【출원인코드】 1-2000-026462-9

【사건과의 관계】 출원인

【제출인】

【명칭】 (주)바이오리더스재팬

【출원인코드】 5-2003-034344-4

【사건과의 관계】 출원인

【제출인】

【명칭】 (주)엠디랩

【출원인코드】 1-2001-039726-2

【사건과의 관계】 출원인

【제출인】

【명칭】 한국생명공학연구원

【출원인코드】 3-1999-034166-5

【사건과의 관계】 출원인

【대리인】

【성명】 이처영

【대리인코드】 9-2003-000118-9

【포괄위임등록번호】 2003-021868-5

【포괄위임등록번호】 2003-062807-6

【포괄위임등록번호】 2003-038714-6

【포괄위임등록번호】 2003-020869-0

【사건의 표시】

【출원번호】 10-2003-0035993

【출원일자】 2003.06.04

【발명의 명칭】 사스 바이러스 항원의 세포표면 발현벡터 및 상기 벡터의 의해 형질전환된 미생물

【제출원인】

【접수번호】 1-1-2003-0200737-62

【접수일자】	2003.06.04
【보정할 서류】	특허출원서
【보정할 사항】	
【보정대상항목】	발명자
【보정방법】	정정
【보정내용】	
【발명자】	
【성명의 국문표기】	성문희
【성명의 영문표기】	SUNG, MOON HEE
【주민등록번호】	570603-1024010
【우편번호】	305-308
【주소】	대전광역시 유성구 장대동 325-6 야베스빌라 302호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김철중
【성명의 영문표기】	KIM, CHUL JOONG
【주민등록번호】	561213-1002325
【우편번호】	305-707
【주소】	대전광역시 유성구 신성동 삼성한울아파트 103-801
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	정창민
【성명의 영문표기】	JUNG, CHANG MIN
【주민등록번호】	630118-1047119
【우편번호】	135-010
【주소】	서울특별시 강남구 논현동 132-15
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	홍승표
【성명의 영문표기】	HONG, SEUNG PYO
【주민등록번호】	650826-1019514
【우편번호】	305-751

【주소】	대전광역시 유성구 송강동 송강그린아파트
	310-1503
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이종수
【성명의 영문표기】	LEE, JONG SU
【주민등록번호】	740226-1251211
【우편번호】	456-110
【주소】	경기도 안성시 낙원동 59
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	최재철
【성명의 영문표기】	CHOI, JAE CHUL
【주민등록번호】	770825-1675028
【우편번호】	703-805
【주소】	대구광역시 서구 내당4동 410-7
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김광
【성명의 영문표기】	KIM, KWANG
【주민등록번호】	680225-1823017
【우편번호】	305-720
【주소】	대전광역시 유성구 신성동 대림두레아파트 103-506
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	주니치구로다
【성명의 영문표기】	SHUNICHI, KURODA
【주소】	7-C-104 가미야마다 수이타, 오사카 565-0872
【국적】	JP
【발명자】	
【성명의 국문표기】	부하령
【성명의 영문표기】	POO, HA RYOUNG
【주민등록번호】	610116-2002425

20030035993

출력 일자: 2004/6/11

【우편번호】

305-330

【주소】

대전광역시 유성구 지족동 858 열매아파트 408-501

【국적】

KR

【취지】

특허법시행규칙 제13조·실용신안법시행규칙 제8조의 규
정에 의하여 위와 같 이 제출합니다. 대리인
이처영 (인)

【수수료】

【보정료】

0 원

【기타 수수료】

0 원

【합계】

0 원

【첨부서류】

1. 기타첨부서류_1통